

<p>(51) 国際特許分類6 C07K 7/06, A23K 1/16, A23L 1/305, A61K 38/08, 38/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/00890</p> <p>(43) 国際公開日 1997年1月9日(09.01.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01264</p> <p>(22) 国際出願日 1995年6月23日(23.06.95)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 阪急共栄物産株式会社 (HANKYU-KYOEI BUSSAN CO., LTD.)(JP/JP) 〒530 大阪府大阪市北区角田町8番7号 Osaka, (JP)</p> <p>(71) 出願人 (KRについてのみ) 伊藤ハム株式会社(ITO HAM FOODS INC.)(JP/JP) 〒657 兵庫県神戸市灘区備後町3丁目2番1号 Hyogo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 香川恭一(KAGAWA, Kyoichi)(JP/JP) 福浜千津子(FUKUHAMA, Chizuko)(JP/JP) 松高寿子(MATSUTAKA, Hisako)(JP/JP) 〒563 大阪府池田市古江町180番地 阪急共栄物産株式会社 薬理研究所内 Osaka, (JP)</p>		<p>中村豊郎(NAKAMURA, Toyoo)(JP/JP) 沼田正寛(NUMATA, Masahiro)(JP/JP) 渡辺重明(WATANABE, Shigeaki)(JP/JP) 本田和久(HONDA, Kazuhisa)(JP/JP) 〒302-01 茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘1-2 伊藤ハム株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 虎ノ門中田ビル2F Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, FI, KR, NO, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PEPTIDE THAT INHIBITS BLOOD TRIGLYCERIDE LEVEL RISE AND BLOOD TRIGLYCERIDE LEVEL RISE INHIBITOR CONTAINING SAID PEPTIDE AS ACTIVE INGREDIENT</p> <p>(54) 発明の名称 血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド及び当該ペプチドを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤</p> <p>(57) Abstract A peptide having an amino acid sequence as specified in the Sequence Listing and a peptide described therein; a blood triglyceride level rise inhibitor containing Val-Tyr-Pro and/or Val-Thr-Leu as the active ingredient; a specified health food containing the above peptide(s) as the active ingredient and having the function of inhibiting blood triglyceride level rise; and a feed containing the above peptide(s) as the active ingredient and having the function of inhibiting blood triglyceride level rise. The invention enables prevention or treatment of human or animal obesity, hyperlipemia and accompanying circulatory diseases such as hypertension and arteriosclerosis, and improvements in the meat quality of livestock and culture fish.</p> <p style="text-align: right;">Express Mail No. EV206807498US</p>		

本発明は、アミノ酸配列が配列表に示されたペプチド並びに当該配列表記載のペプチド、Val-Tyr-Pro 及び／又はVal-Thr-Leu を有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤、これらのペプチドを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品及びこれらのペプチドを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料である。

本発明により、人若しくは動物の肥満や高脂血症及びそれらに伴う高血圧症や動脈硬化症等の循環器系疾患の予防や治療が可能になる。さらには、家畜や養殖魚における肉質の改善が可能になる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AT	オーストリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SD	スーダン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MC	モナコ	SK	スロヴァキア
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SN	セネガル
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TD	チャド
CA	カナダ	IE	アイアランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IS	アイスランド	MR	モリタニア	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TR	トルコ
CI	コート・ジボアール	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CM	カメルーン	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	アメリカ合衆国
CU	キューバ	KR	大韓民国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	NZ	ニュージーランド	VN	ヴェトナム

血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド及び当該ペプチドを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤

技術分野

本発明は、新規の血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤、血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品（いわゆる機能性食品）及び血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料に関する。

なお、本発明トリグリセリド濃度上昇抑制剤の投与による脂血清浄作用により人若しくは動物の肥満や高脂血症及びそれらに伴う高血圧症や動脈硬化症等の循環器系疾患の予防や治療が可能になる。さらには、家畜や養殖魚における肉質の改善が可能になる。

背景技術

脂肪や糖質を過剰に摂取すると肥満や高脂血症の原因となることが知られている。そして高脂血症における血中トリグリセリド（以下、TGと記載することがある）濃度の上昇は、高血圧症や動脈硬化症を引き起こす原因となるといわれている。そこで現在、TGの血中濃度の上昇を抑制して肥満や高脂血症を改善する試みが多くなされている。

現在、TGの血中濃度の上昇を抑制するために、食事制限やダイエット食（例えば、ファイバー）の摂取、さらには各種の医薬品の投与が行われている。当該医薬品としては、例えば血中リポ蛋白リパーゼ活性を高めるデキストラン硫酸、脂質吸収を抑制するニコモール、脂質代謝改善剤であるクロフィブラートやブラバスタチン等が現在用いられている。

しかし、食事制限はそれをする者にとって苦痛であり、また上記医薬品の投与による副作用の惹起も懸念されている。よって、より強力な血中TG濃度の上昇抑制効果を有し、かつ副作用が起こることが懸念されない血中TG濃度上昇抑制

剤の開発が待たれている。

一方、家畜や養殖魚に対しては、現在、成長の促進を企図して濃厚飼料が与えられている。その結果としてこれらの家畜や養殖魚中においても脂肪代謝異常がおこり血中TGの濃度が上昇する傾向にある。血中TG濃度の上昇によって、家畜や養殖魚中の脂肪含有率が過剰になり、脂肪摂取過多の原因となる。その上、味覚の点でも消費者の嗜好に合わなくなっている。また、これらの脂肪含有率の増加は飼料の浪費問題、ひいては屠体に付着した脂肪の廃棄問題等にも関連する重要な問題である。よって血中のTGの上昇を抑制することは、特に我が国の畜産界や水産界における急務である。

最近では、本発明者の一人が加わって開発したオリゴペプチド含有物についての出願がされ（国際公開番号 W089/06970 公報）、さらに当該類似技術について特開平2-154693号公報に記載されている。

また、ある種のオリゴペプチドが血中TGの上昇抑制効果を含む脂質代謝改善効果を有することが明らかにされている（香川恭一：月刊フードケミカル，6，80(1990)，福浜千津子等：日本薬理学雑誌，97，p38(1991)）。

発明の開示

上記の出願公報等において開示されたオリゴペプチド含有物は、その組成が蛋白の分解物の混合物であり、真の有効成分、すなわち有効成分としてのペプチドのアミノ酸配列は明らかにされていない。

このことは、当該ペプチド含有物は医薬品として応用するには純度が低い。さらに、食品に配合した場合に食品中のペプチドと区別して定量することが困難になり、品質管理上の問題がある。

そこで、当該ペプチド含有物の真の有効成分、すなわち有効成分としての血中TG濃度上昇抑制ペプチドを探索するのが課題となる。

すなわち本発明は、上記有効成分としてのペプチドのアミノ酸配列の解析並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血中TG濃度上昇抑制剤、血中TG濃度上昇抑制機能を付与した機能性食品及び血中TG濃度上昇抑制機能を付与した飼料の提供を課題とする。

本発明者は上記課題を解決のために鋭意検討した結果、以下の発明により上記課題が解決され得ることを見出した。

すなわち、本発明は以下の事項をその要旨とするものである。

- (1) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド。
- (2) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド及び／又はVal-Tyr-Pro及び／又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤。
- (3) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び／又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品。
- (4) アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び／又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料。

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明ペプチドである、アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド及び本発明血中TG濃度上昇抑制剤中に有効成分として含有されることのあるVal-Tyr-ProとVal-Thr-Leu（以下、本発明ペプチド等と記載する）は、自然界に存在する蛋白質から分離精製することが可能である。また、これを直接通常公知の方法により化学合成することが可能である。さらに上記ペプチド配列に対応した塩基配列を有する遺伝子を調製してこれを適切な発現ベクターに組み込んで、当該遺伝子を適切な宿主中で発現させることにより本発明ペプチドを調製することもできる。

A. 以下に、自然界に存在する蛋白質から上記ペプチドを分離精製する手段について説明する。

本発明ペプチド等の原材料としては、魚肉蛋白、魚粉、グロビン等の動物性蛋白質；小麦グルテン、大豆カゼイン等の植物性蛋白質等を広く用いることができる。

これらの蛋白質の中でも、ヘモグロビンやミオグロビン等のグロビン蛋白は、血中TG濃度の上昇を抑制するという所期の効果を強く奏し得るという点において特に好ましい。

なお、かかるグロビン蛋白の提供源である動物の種類は特に限定されず、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヒト、ウマ等の血液を広く用いることができる。

次に上記の蛋白質を加水分解することが必要である。当該加水分解に関する操作等は、前出の国際公開番号 W089/06970 公報記載の方法に従う。また用いる加水分解酵素としては、例えば酸性プロテアーゼ、中性プロテアーゼ又はアルカリ性プロテアーゼの1種若しくは2種以上を用いることができる。

ここに、グロビンの蛋白を加水分解する際の条件等について述べる。

まず、グロビン蛋白含有物を固形分として水に5～30重量%になるように分散させ、酸若しくはアルカリによってプロテアーゼの至適pHに調整し、プロテアーゼを一度に若しくは逐次的に添加して、20～70℃の温度で3～48時間、当該酵素を反応させて加水分解反応を行うことができる。

次に、得られた蛋白分解物を乾燥して又は当該蛋白分解物にカルボキシメチルセルロースあるいはデキストリン等の増量剤を適量加えて、乾燥・固化することにより、血中TG濃度上昇抑制効果を有する蛋白分解物を得ることができる（以下、分解物と記載する）。

かかる分解物は、上記本発明ペプチド等を最低でも0.1重量%含有する。

次にここで酵素処理を行った本発明蛋白分解物の精製を行う。かかる精製工程は通常公知の精製工程を採用することができる。

すなわち、イオン交換樹脂法、限外濾過法、逆相クロマトグラフィー法等を適宜組み合わせ、所望のペプチドを包含するフラクションを精製することができる。

なお上記分離手段において、イオン交換樹脂法や限外濾過法による操作は必ずしも必須のものではないが、分離・精製度を向上させ得るという観点から分離・精製工程に組み入れるのが好ましい。

酸性下における逆相クロマトグラフィーと中性下における逆相クロマトグラフィーにおける操作を組み合わせることによって分離・精製が可能である。また、フラクション中の蛋白量は通常公知の蛋白定量法、例えばニンヒドリン法等によって測定することが可能である。

そして、このようにして選別したフラクションのアミノ酸配列は、通常公知の

方法により同定することによって、本発明ペプチド等の存在を確認することができる。

このように分離したフラクションに由来する本発明ペプチド等を本発明血中TG濃度上昇抑制剤の有効成分として用いることができる。

また、さらにこのようにして分離されたフラクションを、直接本発明血中TG濃度上昇抑制剤の有効成分として用いることもできる。

さらに本発明ペプチド等は、通常公知のペプチド合成法によって化学合成することができる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法、DCC-アディップ(HOMB, HOBt, HOSu)法(「ザ ペプチド(The Peptide)」第1巻(1966年), Schreder & Luhke 著, Academic Press, New York, USA;あるいは「ペプチド合成」泉谷ら著, 丸善株式会社(1975年)等)等のペプチド合成法を例示することができる。

なお上記のペプチド合成法においては、固相合成法又は液相合成法のいずれでも行うことができる。

また上記ペプチド合成法においては、側鎖官能基を有するアミノ酸、例えばチロシンやスレオニンは、当該側鎖官能基を保護しておくのが好ましい。これに用いられる保護基としては、通常公知の保護基、例えばベンジルオキシカルボニル基(Cbz-)、t-ブトキシカルボニル基(Boc-)、ベンジル基(Bz-)等を用いることができる。

なお、当該保護基は通常公知の方法で、本発明ペプチド等の合成工程において脱保護を行うことができる。

B. 本発明ペプチド等を有効成分として、血中TG濃度上昇抑制剤を調製することができる。

当該血中TG濃度上昇抑制剤の担体としては、使用形態に応じた製剤を調製するのに通常慣用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤等の賦形剤ないしは希釈剤をいずれも使用できる。製剤組成形態は、これが本発明ペプチド等を効果的に含有する形態であれば特に限定はなく、例えば錠剤、粉末剤、顆粒剤、丸剤等の固剤であってもよい。また、液剤、懸濁剤、乳剤等の注射

剤形態とすることもできる。また、これは使用前に適量の担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることもできる。これらはいずれも常法に従い調製できる。

かくして得られる血中TG濃度上昇抑制剤の投与量は、当該製剤の投与方法、投与形態、投与する患者の症状等に応じて適宜選択される。

一般には、本発明ペプチド等を約0.001～80重量%程度を含有する製剤形態に調製して、当該製剤に含有される本発明ペプチド等の量が一日成人一人当たり、約1mg～100mg程度となる範囲で投与するのが好ましい。なお、当該投与は必ずしも一日一回である必要はなく一日3～4回に分割して投与することも可能である。

上記各種形態の医薬製剤は、その形態に応じた適切な投与経路、例えば注射剤形態においては、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、腹腔内投与等により、固剤形態の医薬製剤は、経口投与等により投与され得る。

C. 本発明ペプチド等を有効成分として、特定保健用食品（いわゆる機能性食品）を調製することができる。また、当該ペプチドを一般食品の食品添加物として用いることもできる。

上記食品の種類としては特に限定されず、ミルク、プリン、カレー、ハヤシ、シチュー、ミートソース、ハム、ケーキ、チョコレート等に適用することが可能である。

特にミルクは、小児が直接摂取することが味覚の点で困難である本発明ペプチド等の摂取を容易にし得るという点において好ましい。また、本発明ペプチド等をケーキ、チョコレート等の本来的に肥満を助長する食品に添加することは、当該食品の摂取による肥満を予防し得るという点において好ましい。

本発明ペプチド等の上記食品中における配合量は、食品の種類、添加する目的、当該食品の摂取によって期待する効果等に応じて適宜選択される。

一般には、本発明ペプチド等換算で一食当たり0.1mg～4mg程度の摂取が可能な程度に、本発明ペプチド等を上記食品中に含有させるのが好ましい。

D. 本発明ペプチド等を飼料に配合することによって、家畜等の血中TG濃度の上昇抑制能が付与された飼料を調製することができる。

本発明ペプチド等が配合される飼料は、牛、豚、鶏等の家畜用飼料であると、タイ、ハマチ等の養殖魚用飼料であるとを問わない。

本発明ペプチド等の飼料中への配合量は、飼料の種類、当該飼料の摂取によって期待する効果等に応じて適宜選択される。

一般には、飼料中に本発明ペプチド等換算で0.1～4重量%の割合で配合するのが好ましい。

図面の簡単な説明

図1は、グロビン蛋白分解物のゲルクロマトグラムである。

図2は、実施例1における逆相（酸性）クロマトグラムである。

図3は、実施例1における逆相（中性）クロマトグラムである。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例等を記載して本発明をさらに具体的に説明する。ただし本発明の技術的範囲が本実施例等によって限定されるものではない。

〔参考例〕 グロビン蛋白分解物の製造

以下にウシ赤血球を用いた製法の詳細を示す。なお、分子量分布はゲル濾過クロマトグラフィー法を用いて調べた（図1）。

なお、当該クロマトグラフィーは以下の条件で実施した。

装置 : 高速液体クロマトグラフ（（株）島津製作所, LC-6A型）

カラム : PolyHYDROXYETHYL A, 5 μ m, 9.4 \times 200mm, PolyC Inc製

溶出溶媒 : 50mMギ酸

流速 : 0.5ml/分

検出 : 紫外吸収（221nm）

新鮮なウシ赤血球100kgに水250 lを加えて充分溶血させ、リン酸を加えてpHを2.8に調整した後、アスペルギルス・ニガーの酸性プロテアーゼ 2.6×10^7 単位を添加し、50℃、3時間反応させた。

反応後、反応液を80℃で30分間加熱して反応を停止させた後、水酸化カルシウムの水懸濁液を加えてpHを6.5に調整し、珪藻土10kgを加え、フィルタープレス

を用いて濾過し、得られた濾液を噴霧乾燥して23kgの粉末を得た。

〔実施例1〕血中TG濃度上昇抑制ペプチドの分画精製法

本発明ペプチド等は下記の実施例に示す、1. イオン交換、2. 限外濾過、3. 酸性下における逆相カラムクロマトグラフィーによる分離、4. 中性下における逆相クロマトグラフィーによる分離という手順をおって得た。

これらの操作を用いた際の回収率は表1に示した。なお、蛋白量はニンヒドリン法によって測定した。

表1 脂肪細胞分化抑制ペプチドのグロビン蛋白分解物からの回収率

画 分	蛋白重量(g)	収率(%)	定 量 法
グロビン蛋白分解物	13.7	100	酸加水分解後ニンヒドリン法
イオン交換+限外濾過	4.24	30.9	同上
逆相(酸性)クロマトグラフィー			
①画分A	0.039	0.28	酸加水分解後アミノ酸分析
②画分A'	0.0005	0.004	同上
逆相(中性)クロマトグラフィー			
③ Val-Thr-Leu (画分B)	0.009	0.06	同上
④ Val-Tyr-Pro (画分C)	0.006	0.04	同上

1. イオン交換

グロビン蛋白分解物10重量%水溶液を、弱酸性陽イオン交換樹脂(アンバーライトIRC50, オルガノ(株), H⁺型)に加え、1時間攪拌して吸着させた後、未吸着画分を得た。

2. 限外濾過

イオン交換処理により得られた未吸着画分について、攪拌型限外濾過装置(アドバンテック(株)製, UHP 90K)、限外濾過膜(アドバンテック(株)製, U11 H-1, 分画分子量1000)により限外濾過を行い濾液を採取した。

3. 逆相(酸性)クロマトグラフィー(図2)

装置 : 高速液体クロマトグラフ((株)島津製作所, LC-10A型)

カラム : SuperPac Pep-S, 15 μ m, 22.5 \times 250mm, ファルマシア(株)製

溶出溶媒 : 0.1%トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリル水溶液、アセト

ニトリル濃度 2 % から 35 % まで直線的濃度勾配、アセトニトリル濃度は 1 % / 分で変化させる。

流速 : 5 ml / 分

温度 : 40°C

検出 : 220nm

分取時間 画分 A : 39.9分～40.4分

画分 A' (配列番号 1) : 53.8分～54.5分

4. 逆相 (中性) クロマトグラフィ (図 3)

装置 : 高速液体クロマトグラフ ((株) 島津製作所, LC-10A型)

カラム : SuperPac Pep-S, 15 μ m, 22.5×250mm, ファルマシア (株) 製

溶出溶媒 : 20mM酢酸アンモニウム緩衝液 (pH6.5) を含有する

アセトニトリル水溶液、アセトニトリル濃度 0 % ～ 25 % まで直線的濃度勾配、アセトニトリル濃度 0.5 % / 分で変化させる。

流速 : 5 ml / 分

温度 : 40°C

検出 : 紫外吸収 (220nm)

分取時間 : ①画分 B 41.7分～43.2分 (Val-Thr-Leu)

②画分 C 45.8分～51.0分 (Val-Thr-Pro)

〔実施例 2〕 血中 TG 濃度上昇抑制ペプチドの定量

参考例で得たグロビン蛋白分解物中の血中 TG 濃度上昇抑制活性を有するペプチド画分の定量を実施例 1 に示した有効ペプチドの精製法に準じて行った。

酸加水分解

蛋白量 3 ～ 5 mg に対して、最終濃度 6 N 塩酸 1 ml を試験管に入れ、ニンヒドリン法の場合は常圧下、アミノ酸分析の場合は減圧下にて封管し、110°C, 22 時間加熱した。

ニンヒドリン法

加水分解後の検体を水酸化ナトリウムにより pH5.0 に調整し、0.2M クエン酸緩衝液 (pH5.0) を含有したニンヒドリン試薬を用いて 110°C、15 分間反応させ、57

0nmにおける吸光度を測定した。別に、標準溶液としてL-ロイシン水溶液（0.75, 150, 225, 300nmol/ml）についてニンヒドリン反応を行い、得られた吸光度から検量線を求め、検体のL-ロイシン相当アミノ基量を算出した。

ペプチドマップ

装置 : 高速液体クロマトグラフ（（株）島津製作所, LC-6A型）
カラム : Shim-pack ISC-07/S1504 Na, 7 μ m, 4.0×150mm, （株）島津製作所製
溶出溶媒 : 島津製作所（株）製アミノ酸移動相キット（Na型）
流速 : 0.3 ml/分
温度 : 55℃
反応液 1 : 島津製作所（株）製分析キットOPA 試薬
検出 : 蛍光吸収（Ex 348nm, Em 450nm）

標準溶液

アミノ酸混合標準液18成分 H型（和光純薬工業（株））を0.2Mクエン酸緩衝液（pH2.20）により25倍希釈後、10 μ l 注入した（各アミノ酸 1 nmol/10 μ l）。

検体溶液

酸加水分解後、溶液をロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、さらに減圧下12時間以上乾燥させ、完全に塩酸を除去した。次に、各アミノ酸含量が100 nmol/ml程度となるよう0.2Mクエン酸緩衝液（pH2.20）に溶解し、0.45 μ m フィルター濾液を10 μ l 注入した。アミノ酸の同定とピーク面積算出をクロマトパックC-R4A（（株）島津製作所製）により解析した。アミノ酸量の算出は、標準溶液との面積比により求めた。アミノ酸組成は、得られたアミノ酸含量の合計に対する各アミノ酸量の比率により算出した。

結果は、収率として上記表1に記載した。

〔実施例3〕化学合成によるH-Val-Thr-Leu-OHの調製

SAM2ペプチド合成装置（Biosearch社製）により、同装置のプロトコールに従ってH-Val-Thr-Leu-OHを合成した。すなわち、1gあたり0.3mmolの3番目の保護ア

ミノ酸Boc-Leu-OHを結合したアシルオキシメチル樹脂2gを上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、45v/v%トリフルオロ酢酸(TFA), 2.5v/v%アニソール, 52.5v/v%塩化メチレン(DCM)を含むデブロック液と20分間接触させて、Boc基を除いた。DCMによる洗浄の後、10v/v%ジイソプロピルエチレンアミンを含むDCMによって樹脂を中和し、これをさらにDCMにより洗浄した。その後、4.0mmolのBoc-Thr-OH及びジイソプロピルカルボジイミド(それぞれ理論当量の6.7倍)を含む20mlのDCMとジメチルホルムアミド(DMF)の混合液中で2時間室温にて反応せしめた。かかる後、DMFとDCMで順次洗浄して、Boc-Thr(Bz)-Leu-PAM樹脂を得た。

次に同様の工程に従い、Boc-Val-OHをカップリングした。

上記のようにカップリングした保護ペプチド樹脂を10v/v%アニソールを含む無水フッ化水素中で1時間・0℃にて反応させた後、フッ化水素を留去してエーテルによる洗浄を行った。得られたペプチド及び樹脂の混合物から、50%酢酸にてペプチドを抽出し、凍結乾燥によって約250mgの粗ペプチドを得た。

当該粗ペプチドを0.1%TFAに溶解した後、オクタデシルシリカ(ODS)カラム(Cosmosil 5C₁₈, 250×20mm: ナカライテスク社製)により、0.1%のTFAを含むアセトニトリルの直線的濃度勾配(20~70%/50分, 10ml/分)にて展開した。目的とするペプチドは、アセトニトリルの濃度約50%にて溶出された。

〔実施例4〕化学合成による配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドの合成

上記SAM2ペプチド合成装置により、同装置のプロトコールに従って配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成した。すなわち、1gあたり0.3mmolの7番目の保護アミノ酸Boc-Thr(Bz)-OHを結合したアシルオキシメチル樹脂2gを上記ペプチド合成装置の反応容器にセットし、45v/v%トリフルオロ酢酸(TFA), 2.5v/v%アニソール, 52.5v/v%塩化メチレン(DCM)を含むデブロック液と20分間接触させて、Boc基を除いた。DCMによる洗浄の後、10v/v%ジイソプロピルエチレンアミンを含むDCMによって樹脂を中和し、これをさらにDCMにより洗浄した。その後、4.0mmolのBoc-Trp-OH及びジイソプロピルカルボジイミド(それぞれ理論当量の6.7倍)を含む20mlのDCMとDMFの混合液中で2時間室温にて反応せ

しめた。かかるDMFとDCMで順次洗浄して、Boc-Trp-Thr(Bz)-PAM樹脂を得た。

次に同様の工程に従い、Boc-Pro-OH、Boc-Tyr(BrZ)-OH、Boc-Val-OH、Boc-Val-OH及びBoc-Leu-OHを順次カップリングした。

以下、上記実施例3に従ってペプチドを抽出し、凍結乾燥によって約500mgの粗ペプチドを得た。また、実施例3に従い、当該粗ペプチドをODSカラムで展開すると、目的とするペプチドはアセトニトリルの濃度約30%にて溶出された。

〔実施例5〕本発明ペプチド等を含む食品の調製

(1) ①100gの小児用粉ミルクに実施例3で合成したH-Val-Thr-Leu-OHを0.1g添加して、血中TG濃度上昇抑制能を有する粉ミルクを調製した。

②100gの小児用粉ミルクに実施例4で合成した配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するペプチドを0.1g添加して、血中TG濃度上昇抑制能を有する粉ミルクを調製した。

(2) ①100gのチョコレートに実施例3で合成したH-Val-Thr-Leu-OHを0.5g添加して、血中TG濃度上昇抑制能を有するチョコレートを調製した。

②100gのチョコレートに実施例4で合成した配列番号1に示されたアミノ酸配列を有するペプチドを0.5g添加して、血中TG濃度上昇抑制能を有するチョコレートを調製した。

〔実施例6〕本発明ペプチド等を含む飼料の調製

ビタミン、ミネラル等が配合されたプレミックスに実施例3で合成したH-Val-Thr-Leu-OHと配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを1重量%の割合でそれぞれ別個に配合して、それぞれの当該プレミックスを市販の養魚用飼料に10%の割合で添加して、血中TG濃度上昇抑制能を有する養魚用飼料を調製した。

〔試験例1〕血中TG濃度上昇抑制剤（化学合成品）の効果（in vivo）

実施例4に示した方法によって合成した本発明ペプチドである3種の血中TG上昇抑制ペプチドである、配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するペプチ

ド及びVal-Thr-LeuおよびVal-Tyr-Proにつきin vivo 脂肪負荷時の血清TG上昇に及ぼす効果を検討した。試験は健康なアルビノマウス（5～10週齢、体重約20～30g）を用いて行った。このマウスにオリーブ油250mgと共に上記ペプチド溶液を経口投与した。3時間後、ネンブータル麻酔下で血液を採取し、当該血液を分離後、血中TG濃度を測定した。結果を表2に示す。

表2 血中TG濃度の測定

投与量 (mg/mouse)	血中TG濃度の上昇率(%)			
	蛋白分解物	Val-Tyr-Pro	Val-Thr-Leu	配列番号1
4×10^{-5}				14
1×10^{-4}				33
4×10^{-4}				33
1×10^{-3}				65
0.1		39	30	
0.2		50	33	
1.0		50	73	
2.5		69	76	
5.0		79	79	
20	40			
40	55			
60	82			
80	86			
ID ₅₀ *	28	0.34	0.43	5.6×10^{-4}
比活性	1	82	65	50000

*1: 50%抑制量(mg/mouse)

その結果、3種の血中TG濃度上昇抑制ペプチドはいずれも血中TG濃度の上昇を抑制した。特に配列番号1で示すアミノ酸配列を有するペプチドは、蛋白分解物のペプチドの50000倍の比活性を示した。一方、他の2種のペプチドは、前記ペプチドの約1/100の比活性であったが、蛋白分解物の50倍以上の比活性を有していた。

〔試験例2〕本発明ペプチド等の安全性試験

雌雄のICR系マウスに本発明ペプチドである配列番号1に示したアミノ酸配列を有するペプチド、Val-Tyr-Pro及びVal-Thr-Leuの投与割合を変更しつつ(0:1,1:1,1:0)、10g/Kg体重以上(投与可能最大量)それぞれ経口投与を行ったが死亡

例はなかった。

産業上の利用可能性

本発明により、血中トリグリセリド濃度上昇抑制ペプチド並びに当該ペプチド等を有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤、血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品（いわゆる機能性食品）及び血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料が提供される。

本発明により、人若しくは動物の肥満や高脂血症及びそれらに伴う高血圧症や動脈硬化症等の循環器系疾患の予防や治療が可能になる。さらには、家畜や養殖魚における肉質の改善が可能になる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr

7

1

5

請 求 の 範 囲

1. アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド。
2. アミノ酸配列が配列番号1であるペプチド及び／又はVal-Tyr-Pro及び／又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤。
3. アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び／又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した特定保健用食品。
4. アミノ酸配列が配列番号1であるペプチドあるいはアミノ酸配列が配列番号1であるペプチド並びにVal-Tyr-Pro及び／又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制機能を付与した飼料。

図 1

図1 グロビン蛋白分解物のゲルクロマトグラム

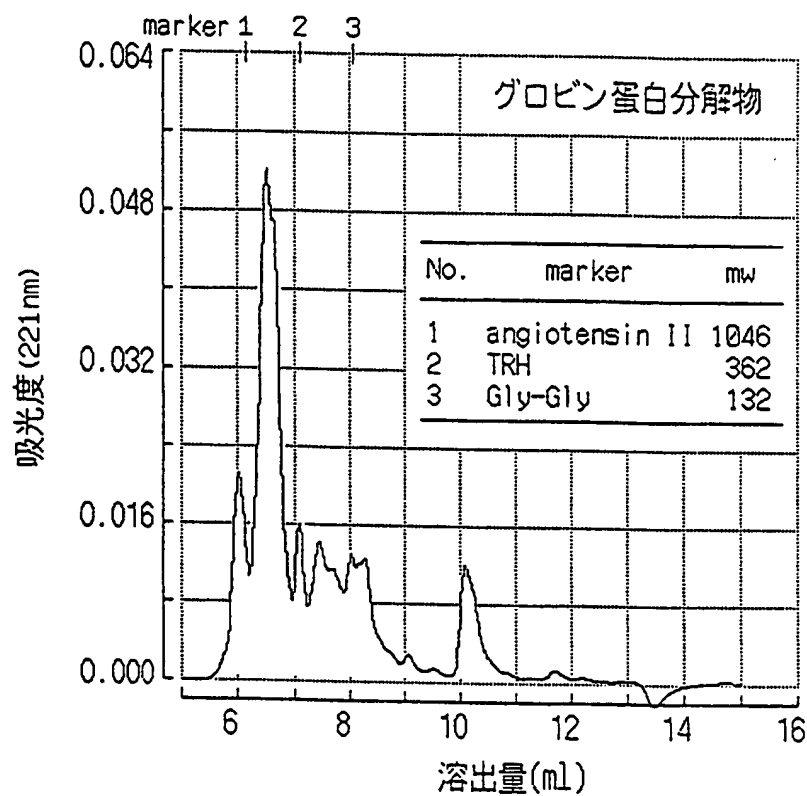


図 2

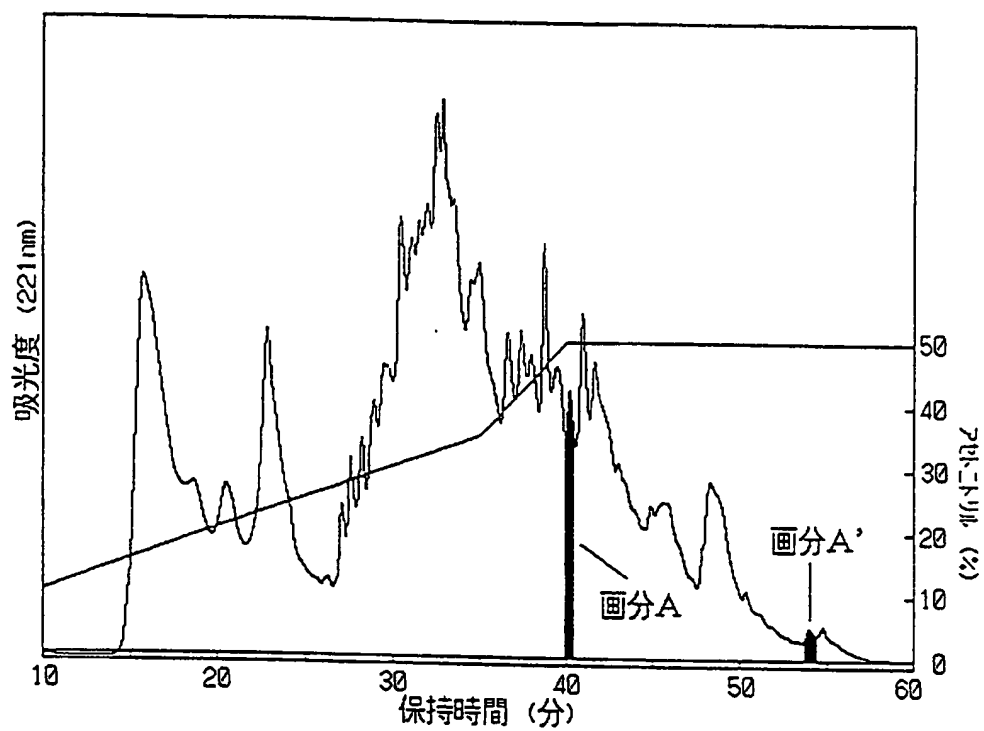
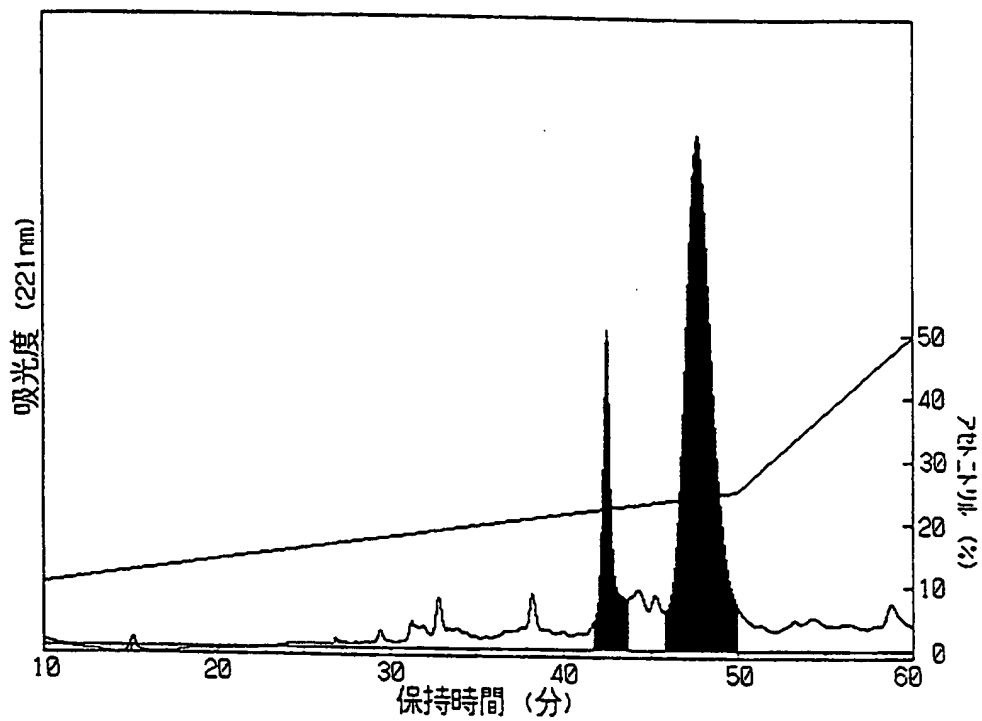


図 2 グロビン蛋白分解物の逆相 (酸性) クロマトグラム

図 3

図3 逆相（中性）クロマトグラム



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP95/01264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C07K7/06, A23K1/16, A23L1/305, A61K38/08, A61K38/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C07K7/06, A23K1/16, A23L1/305, A61K38/08, A61K38/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
EX	JP, 7-188284, A (Ito Ham Foods Inc. and another), July 25, 1995 (25. 07. 95), Claim (Family: none)	1 - 4
X	JP, 3-167199, A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), July 19, 1991 (19. 07. 91), Claim	1
A	Lines 5 to 19, upper left column, page 3 (Family: none)	2 - 4
A	WO, 89/06970, A1 (Hankyu Kyoei Bussan K.K.), August 10, 1989 (10. 08. 89), Claim & AU, 8930370, A &FI, 8904619, A & NO, 8903882, A &EP, 420979, A1 & CA, 1335567, C	1 - 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

August 22, 1995 (22. 08. 95)

Date of mailing of the international search report

September 19, 1995 (19. 09. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 relates to the peptide of SEQ ID No. 1, while claim 2 relates to the blood glyceride level rise inhibitors containing Val-Tyr-Pro and/or Val-Thr-Leu as the active ingredient.

Therefore claim 1 is out of accord with claim 2 with respect to special technical feature.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐
☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;"> Int. Cl.⁸ C 07 K 7 / 06 . A 23 K 1 / 16 . A 23 L 1 / 3 0 5 . A 6 1 K 3 8 / 0 8 . A 6 1 K 3 8 / 0 6 </div>			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;"> Int. Cl.⁸ C 07 K 7 / 06 . A 23 K 1 / 16 . A 23 L 1 / 3 0 5 . A 6 1 K 3 8 / 0 8 . A 6 1 K 3 8 / 0 6 </div>			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;"> CAS ONLINE </div>			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
E X X A	J P, 7-188284, A (伊藤ハム株式会社 外1名), 25. 7月. 1995 (25. 07. 95), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-4	
	J P, 3-167199, A (山之内製薬株式会社), 19. 7月. 1991 (19. 07. 91), 特許請求の範囲 3頁左上欄5行-19行 (ファミリーなし)	1 2-4	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;"> 22. 08. 95 </div>		国際調査報告の発送日 <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;"> 19.09.95 </div>	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) <div style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: 1.2em;"> 福井 悟 </div> 電話番号 03-3581-1101 内線 3444	
		4 H 9 1 6 0	

C (続き). 関連すると認められる

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 89/06970, A1 (阪急共栄物産株式会社), 10. 8月. 1989 (10. 08. 89), 請求の範囲 & AU, 8930370, A & FI, 8904619, A & NO, 8903882, A & EP, 420979, A1 & CA, 1335567, C	1-4

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査が不適切なときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4（a）の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1は、配列番号1であるペプチドに関するものである。

請求の範囲2は、Val-Tyr-Pro及び／又はVal-Thr-Leuを有効成分として含む血中トリグリセリド濃度上昇抑制剤に関するものを含むものである。

したがって、請求の範囲1と2とは特別の技術的特徴が一致していない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみにについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。